

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 10 月 21 日 (21.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/090541 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/53, 33/50, 33/15, A61K 45/00, 31/353, A61P 9/00, 9/10, 25/00, 25/28, 35/00, 37/08
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/004772
- (22) 国際出願日: 2004 年 4 月 1 日 (01.04.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2003-097652 2003 年 4 月 1 日 (01.04.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱ウェルファーマ株式会社 (MITSUBISHI PHARMA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5410046 大阪府大阪市中央区平野町二丁目 6 番 9 号 Osaka (JP).
- (71) 出願人 および
- (72) 発明者: 立花 宏文 (TACHIBANA, Hirofumi) [JP/JP]; 〒8130016 福岡県福岡市東区香椎浜四丁目 7 番 8 号 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 高柳 昌生 (TAKAYANAGI, Masau); 〒1038405 東京都中央区日本橋本町二丁目 2 番 6 号三菱ウェルファーマ株式会社 知的財産部 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF SCREENING DRUG WITH THE USE OF 67 kDa LAMININ RECEPTOR AND DRUG OBTAINED THEREBY

(54) 発明の名称: 67 kDa ラミニン・レセプターを用いた薬物のスクリーニング方法及びそれにより得られる薬物

(57) Abstract: It is intended to provide a novel method of screening a drug with the use of a 67 kDa laminin receptor and a drug obtained thereby. A method of screening a drug having an effect of inhibiting cell proliferation, an angiogenesis inhibitory effect, an effect of inhibiting cancer cell metastasis, a nerve protecting effect, an antiallergic effect, an antiarteriosclerotic effect and/or an effect of inhibiting infection with Creutzfeldt-Jakob disease which involves the step of qualitatively or quantitatively measuring the degree of the binding of a test compound to a 67 kDa laminin receptor, and judging that the test compound is a drug having an effect of inhibiting cell proliferation, an angiogenesis inhibitory effect, an effect of inhibiting cancer cell metastasis, a nerve protecting effect, an antiallergic effect, an antiarteriosclerotic effect and/or an effect of inhibiting infection with Creutzfeldt-Jakob disease in the case where it is found out by the results of the measurement that the test compound binds to the 67 kDa laminin receptor, and a drug obtained thereby.

(57) 要約: 67 kDa ラミニン・レセプターを用いた薬物の新規なスクリーニング方法及びそれにより得られる薬物を提供する。被験化合物と 67 kDa ラミニン・レセプターとの結合の度合いを定性的または定量的に測定し、その測定結果より被験化合物が 67 kDa ラミニン・レセプターに結合する場合にはその被験化合物が細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、癌細胞の転位活性阻害作用、神経保護作用、抗アレルギー作用、抗動脈硬化作用、及び/または、クロイツフェルトヤコブ病感染阻害作用を有する薬物であると判断する工程を含む、細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、癌細胞の転位活性阻害作用、神経保護作用、抗アレルギー作用、抗動脈硬化作用、及び/または、クロイツフェルトヤコブ病感染阻害作用を有する薬物のスクリーニング方法、並びに、それにより得られる薬物。

WO 2004/090541 A1

明細書

67 kDa ラミニン・レセプターを用いた薬物のスクリーニング方法及びそれにより得られる薬物

5 技術分野

本発明は67 kDa ラミニン・レセプターを用いた薬物のスクリーニング方法及びそれにより得られる薬物に関する。

背景技術

10 67 kDa ラミニン・レセプター（以下、「67 LR」と称することもある。）は、295個のアミノ酸をコードするmRNAから翻訳された37 kDa 前駆体蛋白質が、細胞内で脂肪酸等によるアシル化重合反応を受けてホモ二量体またはヘテロ二量体化により67 kDa となった蛋白質であり、
15 それがインテグリン類とともに細胞膜表面へ移行してはじめてラミニン・レセプターとして機能する（Biochemistry, 1995, 34: 11276-11287, T. H. Landowski ら、J. Cell. Biochem, 1998, 69: 244-251, S. Buto ら）。また、37 kDa 前駆体蛋白質は、リボソーム関連蛋白質p40として蛋白合成
20 に関与していることが、さらには多剤耐性関与蛋白質（MGR1-Ag）として報告されていたものと同であることが明らかにされている（Cell. Mol. Life Sci., 2002, 59: 1577-1583, Y. Shi ら）。このラミニン・レセプターの多くの癌細胞での高発現というデータにより、汎腫瘍特異的移植
25 抗原としてのT細胞の免疫原として、腫瘍胎児抗原であると見なされている（Anticancer Research, 1999, 19: 5535-5542, J. H. Coggin, Jr ら）。ラミニン・レセプターは既に67 LR 以外に10数種類報告されているが、その中でも67 LR の癌との関連が強く示唆されている。

6 7 L R は多くの癌において癌細胞での検出の有無から、ヒト癌患者の悪性度を示す重要な予後因子として知られており (Breast Cancer Research and Treatment, 1998, 52: 137-145, S. Menard ら、Clinical Cancer Research, 1997, 3: 227-231, G. Fontanini ら、Clinical Cancer Research, 1996, 2: 1777-1780, F. Basolo ら、J. Natl. Cancer Inst, 1991, 83: 29-36, V. Cioce ら)、動物モデル等では癌細胞の増殖、移動、浸潤、転移等に関与することが示唆されている。たとえば、乳癌患者においては 6 7 L R ポジティブの患者の生存率はネガティブな患者より有為に低いことが報告されている。6 7 L R のリガンドであるラミニンの発現は予後には影響ないが、レセプター 6 7 L R の発現は予後に負の結果をもたらすことが示されている (Breast Cancer Research and Treatment, 1998, 52: 137-145, S. Menard ら)。

これらの知見を下に、6 7 L R の発現を抑制することで抗腫瘍効果を示すことを期待して行われた実験が幾つか報告されている。6 7 L R のアンチセンス RNA を癌細胞株に導入して作製した 6 7 L R 低発現細胞株は、元の親株細胞よりもマウスのインビボにおいて有為に腫瘍増殖能の低下並びに転移能の低下が起り、その結果マウス個体の生存率が改善することが報告されている (British Journal of Cancer, 1999, 80: 1115-1122, K. Satoh ら)。さらには、低 6 7 L R 発現細胞株は親株よりも腫瘍血管新生の低下並びに血管新生促進因子である V E G F の産生そのものも低下していることが報告されている (Cancer Letters, 2000, 153: 161-168, M. Tanaka ら)。同様に、6 7 L R に対する抗体を用いた腫瘍転移実験においても、アンチセンス実験と同様な効果が見とめられている (Jpn. J. Cancer Res., 1999, 90: 425-431, K. Narumi ら)。

3

非腫瘍関連においても、67LRの機能について幾つか報告がなされている。虚血動物モデルにおいて誘導される新生血管の増生が67LRと結合するラミニン由来ペプチド

5 (システイン-アスパラギン酸-プロリン-グリシン-チロシン-イソロイシン-グリシン-セリン-アルギニン) や、EGF由来ペプチド (システイン-バリン-イソロイシン-グリシン-チロシン-セリン-グリシン-アスパラギン酸-アルギニン-システイン) によって抑制されることが報告されている (Am. J. Pathol, 2002, 160: 307-313, D. Gebarowska ら)。血管内皮細胞に対する剪断力によって誘導される動脈硬化との関与が指摘されている eNOS 発現と NO 産生が、67LR と結合するラミニン由来ペプチド (チロシン-イソロイシン-グリシン-セリン-アルギニン) によって抑制することが報告されている (J. Biol. Chem., 15 1999, 274: 15996-16002, T. Gloe ら)。

最近の報告では、67LR がクロイツフェルトヤコブ病の病因と考えられているプリオン蛋白質のレセプターとして働き、プリオンが結合してインタナリゼーションされることが、その結合とインタナリゼーションが膜ドメインを欠いたミュータント 67LR の分泌によって阻害されることが報告されている (EMBO J, 2001, 20: 5863-5875, S. Gauczynski ら)。

20 67LR はまた、T 細胞のサブセットである CD45RO + / CD45RA - のメモリー細胞の CD4 + CD8 - または CD4 - CD8 + のサブセット群で発現していることが報告され、67LR の免疫系への作用が示唆されている (J. Immunol, 1999, 163: 3430-3440, S. M. Canfield ら)。

25 67LR の mRNA 発現に関する報告も幾つか存在する。癌抑制因子である p53 や抗癌因子である TNF- α

一、I F N－ガンマーによってその発現が抑制されることが報告されている（Biochem. Biophys. Res. Commun., 1998, 251: 564-569, N. Clausse ら）。ただし、このような多様な機能に關与すると推定されている 6 7 L R に対する低分子化合物の報告はない。

一方、カテキン類のうち、エピガロカテキンガレート（以下、「E G C G」と称することもある。）は、茶のカテキンの約 5 0 % を占める主用成分である。他に、エピガロカテキン、エピカテキンガレート、エピカテキン（以下それぞれ、「E G C」、「E C G」、「E C」と称することもある）等が含まれる。

茶は古来より薬として用いられて来た古い歴史があり、近代よりその効能と成分の關係が解析されてきた。そのうち E G C G は 1 9 4 7 年、A. Bradfield らによって発見された成分である（J. Chem. Soc., 1947, 32: 2249, A. E. Bradfield ら）。

E G C G を含めて茶のカテキン類の生理作用としては、抗酸化、抗癌、血漿コレステロール上昇抑制、血圧上昇抑制、血小板凝集抑制、血糖上昇抑制、痴呆予防、抗潰瘍、抗炎症、抗アレルギー、抗菌・抗虫菌、抗ウイルス、解毒、腸内フローラ改善、消臭等が報告されている（茶の機能、村松敬一郎ら編、学会出版センター、2002）。

このうち、抗癌作用は非常に多く報告されており、抗変異作用、抗発癌プロモーション作用、抗腫瘍増殖抑制作用、抗浸潤・転移阻害作用、抗血管新生阻害作用がある。最近の報告では、E G C G は白血病細胞の D N A 合成を阻害しアポトーシスを誘導することが（Int. J. Mol. Med., 2001, 7: 645-652, D. M. Smith ら）、また E G C G が乳癌細胞株の増殖を抑制することが報告されている（J. Cell. Biochem.,

5

2001, 82: 387-398, K. T. Kavanagh ら)。さらには、EGCG が正常細胞と比べて癌細胞の増殖を強く抑制するなどの報告がなされている (Arch. Biochem. Biophys, 2000, 376: 338-346, N. Ahmad ら)。

5 浸潤・転移に関しては、カテキン類がマトリゲルを用いた浸潤試験で高転移性細胞の浸潤を抑制することが、また、癌細胞のフィブロネクチンやラミニンへの接着をEGCGが阻害することが報告されている (Cancer Lett., 1995, 98: 27-31, M. Suzuka ら、Cell Biol. Int., 1993, 17: 559-564, M. Isemura ら、Cancer Lett., 2001, 173: 15-20, Y. Suzuki ら)。

10 さらに、これらカテキン作用の分子レベルの解析が最近報告されてきている。たとえば、EGCG は癌との関連が示唆されている Her-2 抗原高発現細胞の増殖を濃度依存的に抑制する。その作用機序は Her-2 のリン酸化抑制によるその下流シグナル伝達の阻害だと報告されている (Cancer Res., 2002, 62: 652-655, S. Pianetti ら)。

15 また、腫瘍増殖と密接な関連がある血管新生をEGCG等カテキンが阻害することが報告されている。そのメカニズムはカテキンが血管内皮細胞の増殖因子である VEGF のレセプター VEGFR-1 のリン酸化を抑制することにあると示されている。これはカテキンの抗酸化・抗ラジカル活性には依存しないと報告されている (Cancer Res, 2002, 62: 381-385, S. Lamy ら)。

20 同様に、他の増殖因子である PDGF-BB による血管平滑筋細胞での PDGF-R ベータのリン酸化をカテキン類が抑制することで、血管の肥厚を抑制することが報告されている (FASEB J, 2002, 16: 893-895, A. Sachinidis ら)。

さらに、E G F - 2 によるインビボでの血管新生並びに内皮細胞の増殖をE G C G が抑制することが報告されている

(Nature, 1999, 389: 381, Y. Cao ら)。E G C G がアポトーシスを誘導するF a s 蛋白質と結合するという報告があるが (Biochem. Biophys. Res. Commun, 2001, 285: 1102-1106, S. Hayakawa ら)、上記E G C G の作用がF a s を関与したものなのか明らかにされておらず、他にE G C G と相互作用する因子の存在が示唆されている。

カテキンには抗腫瘍効果以外にも、種々の生理作用が分子レベルで明らかになってきている。E G C G は肝細胞でのグルコース産生を抑制し、かつインスリンレセプターとI R S - 1 のチロシンリン酸化を促進することで抗糖尿病的作用が報告されている (J. Biol. Chem., 2002, 277: 34933-34940, M. E. Waltner-Law ら)。

また、パーキンソン モデル マウスにおいてE G C G は強く神経保護作用を示す報告から (J. Biol. Chem., 2002, 277: 30574-30580, Y. Levites ら)、多くの神経障害を抑制することが期待されている。アレルギーの要因である好塩基球でのF c イプシロンR I の発現をE G C G やそのメチル化体が抑制することを (J. Agric. Food Chem, 2002, 50: 5729-5734, Y. Fujimura ら)、さらには軟骨においてI L - 1 ベータによって誘導されるC O X - 2 やN O 合成酵素2の発現をE G C G が抑制することが報告されている (Free Radical Biology & Medicin, 2002, 33: 1097-2002, S. Ahmed ら)。

しかし、本発明者らが知る限り、E G C G が6 7 L R を介して細胞増殖抑制因子等として機能すること、また、6 7 L R をターゲットとして細胞増殖抑制作用等を有する低分子化合物の薬物スクリーニングに利用可能なことに関しては、今

まで一切報告されていない。

(非特許文献 1)

Biochemistry, 1995, 34: 11276-11287

(非特許文献 2)

5 J. Cell. Biochem, 1998, 69: 244-251

(非特許文献 3)

Cell. Mol. Life Sci., 2002, 59: 1577-1583

(非特許文献 4)

Anticancer Research, 1999, 19: 5535-5542

10 (非特許文献 5)

Breast Cancer Research and Treatment, 1998, 52: 137-145

(非特許文献 6)

Clinical Cancer Research, 1997, 3: 227-231

(非特許文献 7)

15 Clinical Cancer Research, 1996, 2: 1777-1780

(非特許文献 8)

J. Natl. Cancer Inst, 1991, 83: 29-36

(非特許文献 9)

Breast Cancer Research and Treatment, 1998, 52: 137-145

20 (非特許文献 9)

British Journal of Cancer, 1999, 80: 1115-1122

(非特許文献 10)

Cancer Letters, 2000, 153: 161-168

(非特許文献 11)

25 Jpn. J. Cancer Res., 1999, 90: 425-431

(非特許文献 12)

Am. J. Pathol, 2002, 160: 307-313

(非特許文献 13)

J. Biol. Chem., 1999, 274: 15996-16002

- (非特許文献 1 4.)
EMBO J, 2001, 20: 5863-5875
(非特許文献 1 5.)
J. Immunol, 1999, 163: 3430-3440
- 5 (非特許文献 1 6.)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1998, 251: 564-569
(非特許文献 1 7.)
J. Chem. Soc., 1947, 32: 2249
(非特許文献 1 8.)
- 10 茶の機能、村松敬一郎ら編、学会出版センター、2002
(非特許文献 1 9.)
Int. J. Mol. Med., 2001, 7: 645-652
(非特許文献 2 0.)
J. Cell. Biochem., 2001, 82: 387-398
- 15 (非特許文献 2 1.)
Arch. Biochem. Biophys, 2000, 376: 338-346
(非特許文献 2 2.)
Cancer Lett., 1995, 98: 27-31
(非特許文献 2 3.)
- 20 Cell Biol. Int., 1993, 17: 559-564
(非特許文献 2 4.)
Cancer Lett., 2001, 173: 15-20
(非特許文献 2 5.)
Cancer Res., 2002, 62: 652-655
- 25 (非特許文献 2 6.)
Cancer Res, 2002, 62: 381-385
(非特許文献 2 7.)
FASEB J, 2002, 16: 893-895
(非特許文献 2 8.)

Nature, 1999, 389: 381

(非特許文献 2 9)

Biochem. Biophys. Res. Commun, 2001, 285: 1102-1106

(非特許文献 3 0)

5 J. Biol. Chem., 2002, 277: 34933-34940

(非特許文献 3 1)

J. Biol. Chem., 2002, 277: 30574-30580

(非特許文献 3 2)

J. Agric. Food Chem, 2002, 50: 5729-5734

10 (非特許文献 3 3)

Free Radical Biology & Medicin, 2002, 33: 1097-2002

発明の開示

15 本発明者は、上記課題に鑑み鋭意検討した結果、67LR
が細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、癌細胞の転移活性
阻害作用、神経保護作用、抗アレルギー作用、抗動脈硬化作
用、及び／または、クロイツフェルトヤコブ病感染阻害作用
を有する薬物のターゲットとして使用可能なことを見出し本
発明を完成するに至った。

20 即ち本発明は下記の通りである。

[1] 被験化合物と67kDaラミニン・レセプターとの結
合の度合いを定性的または定量的に測定し、その測定結果よ
り被験化合物が67kDaラミニン・レセプターに結合する
場合にはその被験化合物が細胞増殖抑制作用、血管新生阻害
25 作用、癌細胞の転移活性阻害作用、神経保護作用、抗アレル
ギー作用、抗動脈硬化作用、及び／または、クロイツフェル
トヤコブ病感染阻害作用を有する薬物であると判断する工程
を含む、細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、癌細胞の転
移活性阻害作用、神経保護作用、抗アレルギー作用、抗動脈

硬化作用、及び／または、クロイツフェルトヤコブ病感染阻害作用を有する薬物のスクリーニング方法。

[2]薬物が、細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、及び／または、癌細胞の転移活性阻害作用を有する薬物である[1]記載のスクリーニング方法。

[3][1]または[2]に記載のスクリーニング方法により得られる薬物。

[4]有効成分がガロイル基を有する化合物である[1]から[3]のいずれかに記載の薬物。

[5]化合物が、カテキン類である[4]記載の薬物。

[6]カテキン類がエピガロカテキン ガレートである[5]記載の薬物。

[7]細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、癌細胞の転移活性阻害作用、神経保護作用、抗アレルギー作用、抗動脈硬化作用、及び／または、クロイツフェルトヤコブ病感染阻害作用により予防及び／または治療し得る疾患のために用いられる[3]から[6]のいずれかに記載の薬物。

[8]細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、及び／または、癌細胞の転移活性阻害作用により予防及び／または治療し得る疾患のために用いられる[3]から[6]のいずれかに記載の薬物。

[9]疾患が癌である[8]記載の薬物。

[10][3]から[9]のいずれかに記載の薬物を化学合成方法により製造する工程、及び、薬学的に許容され得る担体を配合する工程を含む、医薬品組成物の製造方法。

[11][10]記載の製造方法により得られる医薬品組成物。

[12]ガロイル基を有する化合物及び被験化合物と67kDaラミニン・レセプターとの結合の度合いを定性的または定

量的に測定し、その測定結果より被験化合物と 67 kDa ラミニン・レセプターとの結合の度合いが、ガロイル基を有する化合物と 67 kDa ラミニン・レセプターとの結合の度合いを上回る場合には、その被験化合物がカテキン類が有する薬理学的作用と同一の作用を有する薬物であると判断する工程を含む、薬物のスクリーニング方法。

[13] ガロイル基を有する化合物の 67 kDa ラミニン・レセプターに対する結合と、被験化合物の 67 kDa ラミニン・レセプターに対する結合とを競合させた結果、被験化合物の 67 kDa ラミニン・レセプターへの結合するサイトと、ガロイル基を有する化合物の 67 kDa ラミニン・レセプターへの結合するサイトとが、同一の場合には、その被験化合物は、ガロイル基を有する化合物が有する薬理学的作用と同一の作用を有する薬物であると判断する工程を含む、薬物のスクリーニング方法。

[14] ガロイル基を有する化合物が有する薬理学的作用が、細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、癌細胞の転移活性阻害作用、神経保護作用、抗アレルギー作用、抗動脈硬化作用、及び／または、クロイツフェルトヤコブ病感染阻害作用である[12]または[13]に記載のスクリーニング方法。

[15] ガロイル基を有する化合物が有する薬理学的作用が、細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、及び／または、癌細胞の転移活性阻害作用である[12]または[13]に記載のスクリーニング方法。

[16] 化合物がガロイル基を有するカテキン類である[12]から[15]のいずれかに記載のスクリーニング方法。

[17] カテキン類がエピガロカテキン ガレートである[12]から[15]のいずれかに記載のスクリーニング方法。

[18][12]から[17]のいずれかに記載のスクリーニング方法により得られる薬物。

- 5 [19]細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、癌細胞の転移活性阻害作用、神経保護作用、抗アレルギー作用、抗動脈硬化作用、及び／または、クロイツフェルトヤコブ病感染阻害作用により予防及び／または治療し得る疾患のために用いられる[18]に記載の薬物。
- 10 [20]細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、及び／または、癌細胞の転移活性阻害作用により予防及び／または治療し得る疾患のために用いられる[18]または[19]に記載の薬物。
[21]疾患が癌である[20]記載の薬物。
- 15 [22][18]から[21]のいずれかに記載の薬物を化学合成方法により製造する工程、及び、薬学的に許容され得る担体を配合する工程を含む、医薬品組成物の製造方法。
- [23][22]に記載の製造方法により得られる医薬品組成物。
[24]67kDaラミニン・レセプターと結合する化合物であって、ガロイル基を有する化合物が該67kDaラミニン・レセプターに結合するサイトと同一のサイトで結合する化合物。
- 20 [25]化合物がカテキン類である[24]記載の化合物。
[26]カテキン類がエピガロカテキンガレートである[26]記載の化合物。
- [27][24]から[26]のいずれかに記載の化合物を含む細胞増殖抑制剤。
- 25 [28][24]から[26]のいずれかに記載の化合物を含む血管新生阻害剤。
[29][24]から[26]のいずれかに記載の化合物を含む癌細胞の転移活性阻害剤。
[30][24]から[26]のいずれかに記載の化合物を含む抗

癌剤。

図面の簡単な説明

第 1 図

- 5 実施例 1 の表面プラズモン共鳴センサによる測定結果を示す図である。

第 2 図

実施例 1 の細胞増殖試験の結果を示す図である。

第 3 図

- 10 実施例 1 の細胞増殖試験の結果を示す図である。

第 4 図

実施例 2 のフローサイトメトリーによる解析結果を示す図である。

第 5 図

- 15 実施例 3 の細胞増殖試験の結果を示す図である。

第 6 図

実施例 3 の表面プラズモン共鳴センサによる測定結果を示す図である。

第 7 図

- 20 実施例 4 の表面プラズモン共鳴センサによる測定結果を示す図である。

第 8 図

実施例 4 の細胞増殖試験の結果を示す図である。

- 25 発明を実施するための最良の形態

以下本発明について詳細に説明する。

本発明は、67LRをターゲットとする薬物の新たなスクリーニング方法を提供するものである。

本発明の一つの態様としては、被験化合物と 67LR との結合の度合いを定性的または定量的に測定し、その測定結果より被験化合物が 67LR に結合する場合にはその被験化合物が細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、癌細胞の転移活性阻害作用、神経保護作用、抗アレルギー作用、抗動脈硬化作用、及び／または、クロイツフェルトヤコブ病感染阻害作用を有する薬物であると判断する工程を含む、細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、癌細胞の転移活性阻害作用、神経保護作用、抗アレルギー作用、抗動脈硬化作用、及び／または、クロイツフェルトヤコブ病感染阻害作用を有する薬物のスクリーニング方法が挙げられる。

本発明で用いられる 67LR はそれ自体公知の蛋白質であり、例えば、GenBank Accession No. NM_002295 登録 cDNA 配列をもとに、常法に従い本蛋白質をコードする配列を挟み込むようにして種々のライブラリーをテンプレートとして PCR を行うことで、67LR の cDNA を取得することが容易に可能である。また、ここで得られた cDNA を市販の種々の vector に蛋白発現が可能な形で挿入することで、容易に本蛋白質を発現する細胞株構築ならびに本蛋白質本体の取得が可能である。これ以外にいくつかの cDNA 取得と蛋白質発現の報告がある (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85: 6394, H. You ら、British Journal of Cancer, 1999, 80: 1115-1122, K. Satoh ら、Biochemistry, 1995, 34: 11276-11287, T. H. Landowski ら)。

なお、67LR は、遺伝子としては 37 kDa の 40S リボソーム結合蛋白質であるが、膜に発現する場合には 67 kDa となることが知られている。本発明においては、膜に発現する場合には 67 kDa となる蛋白質であって、ラミニン

と結合する接着性を有する蛋白質であれば、すべて本発明における 67LR として定義され、完全な蛋白質だけでなく、その部分ペプチドを用いることも可能である。また、67LR は、スクリーニングの手段に応じて、例えば、精製した蛋白質として、可溶型蛋白質として、担体に結合させた形態として、また、他の蛋白質との融合蛋白質として、適宜用いることができる。

本発明においては被験化合物と 67LR とを結合させることにより、細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、癌細胞の転移活性阻害作用、神経保護作用、抗アレルギー作用、抗動脈硬化作用、及び／または、クロイツフェルトヤコブ病感染阻害作用を有する薬物をスクリーニングする。このとき、被験化合物の形態としては、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、生物抽出物、植物抽出物、精製または粗精製蛋白質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成低分子化合物、天然化合物、遺伝子ライブラリー等、通常薬物のスクリーニングに使用される形態であれば良く、特に制限はされない。

被験化合物と 67LR との結合は、被験化合物の形態に応じて適した手段が選択されるが、例えば、被験化合物を 67LR 発現細胞培養液中へ添加する方法等で行うことができる。

上記のようにして、被験化合物と 67LR との結合の度合いを測定するが、ここで用いられる測定方法は、定性的手段及び定量的手段のいずれも用いることが可能である。結合度合いを測定する手段の一例としては、後述の実施例で示すような表面プラズモン共鳴センサを用いる方法が挙げられる。

こうして結合度合いを測定した結果、被験化合物が 67LR に実質的に結合する場合には、その被験化合物が、細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、癌細胞の転移活性阻害作用、神経保護作用、抗アレルギー作用、抗動脈硬化作用、及び／

または、クロイツフェルトヤコブ病感染阻害作用を有する薬物であると判定される。なかでも、本発明のスクリーニング方法は、細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、及び／または、癌細胞の転移活性阻害作用を有する薬物のスクリーニングに用いることが好適である。

後述の実施例に示すように、細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、癌細胞の転移活性阻害作用、神経保護作用、抗アレルギー作用、抗動脈硬化作用、及び／または、クロイツフェルトヤコブ病感染阻害作用を有することが示唆されているガロイル基を有する化合物が、67LRに結合し、その細胞増殖を著しく抑制している。

このことから、ガロイル基を有する化合物は、67LRを介して細胞増殖因子として機能することが示唆され、さらに、ガロイル基を有する化合物と同様に67LRに結合する物質は、ガロイル基を有する化合物と同様の作用、すなわち、細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、癌細胞の転移活性阻害作用、神経保護作用、抗アレルギー作用、抗動脈硬化作用、及び／または、クロイツフェルトヤコブ病感染阻害作用を有すると考えられる。

従って、本発明のスクリーニング方法において、67LRと結合する被験化合物は、細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、癌細胞の転移活性阻害作用、神経保護作用、抗アレルギー作用、抗動脈硬化作用、及び、クロイツフェルトヤコブ病感染阻害作用を有する薬物であると判断できる。

なお、上記で挙げたガロイル基を有する化合物としては、エピガロカテキン ガレート及びその3-メチル置換体やエピカテキン ガレート等のガロイル基を有するカテキン類、ガロイル基を有するポリフェノール類、トリガロイルグルコース、ペンタガロイルグルコース、ストリクチニン、ピロガ

ロール等が挙げられ、好適には、エピガロカテキン ガレートが挙げられる。

次に本発明のスクリーニング方法として、別の態様について説明する。

5 本発明における別の態様としては、67LRに加え、さらにガロイル基を有する化合物を用いた薬物のスクリーニング方法を提供する。すなわち、ガロイル基を有する化合物及び被験化合物と67LRとの結合の度合いを定性的または定量的に測定し、その測定結果より被験化合物と67LRとの結合の度合いが、ガロイル基を有する化合物と67LRとの結合の度合いを上回る場合には、その被験化合物がガロイル基を有する化合物が有する薬理学的作用と同一の作用を有する薬物であると判断する工程を含む、薬物のスクリーニング方法が挙げられる。

10 また、ガロイル基を有する化合物の67kDaラミニン・レセプターに対する結合と、被験化合物の67kDaラミニン・レセプターに対する結合とを競合させた結果、被験化合物の67kDaラミニン・レセプターへの結合するサイトと、ガロイル基を有する化合物の67kDaラミニン・レセプターへの結合するサイトとが、同一の場合には、その被験化合物は、ガロイル基を有する化合物が有する薬理学的作用と同一の作用を有する薬物であると判断する工程を含む、薬物のスクリーニング方法が挙げられる。

15 後述の実施例に示すように、67LRに対するモノクローナル抗体は、ガロイル基を有する化合物の67LRへの結合を阻害し、その結果ガロイル基を有する化合物の細胞増殖抑制効果を阻害している。逆に、ガロイル基を有する化合物は抗67LR抗体の67LRへの結合を阻害している。即ち、ガロイル基を有する化合物の結合部位と抗体認識部位が重な

っている。このことから、ガロイル基を有する化合物及び被
 験化合物を、67LRへの競合反応に供することにより、被
 験化合物がガロイル基を有する化合物と同一のサイトに結合
 する場合には、その被験化合物はガロイル基が有する化合物
 が有する作用と同一の作用を有すると考えられる。

本発明の別の態様である、ガロイル基を有する化合物を使用しないスクリーニング方法についての詳細な説明を前述したが、それらの記載は、ガロイル基を有する化合物を使用する本発明の態様の場合にも適用される。なお、ここで述べる本発明の態様においてスクリーニングに供されるガロイル基を有する化合物は、例えば、後述の実施例に示すように P B S 等の Buffer で適宜希釈して使用するとが可能である。また、被験化合物とガロイル基を有する化合物とを、67RL発現細胞培養液中へ添加することによりそれらの競合反応をおこさせる場合において、被験化合物とガロイル基を有する化合物の添加順序に特に制限はない。

上記のようにしてスクリーニングされた薬物は、細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、癌細胞の転移活性阻害作用、神経保護作用、抗アレルギー作用、抗動脈硬化作用、及び／または、クロイツフェルトヤコブ病感染阻害作用により予防及び／または治療し得る疾患のための薬物として使用可能である。これらの疾患のうち、本発明において最も好適な疾患としては癌が挙げられる。

なお、本発明においては、一旦薬物がスクリーニングによって選択された後は、その薬物は通常の化学合成方法等により製造することが可能である。また、薬学的に許容され得る担体を配合することも可能である。すなわち、本発明においては、上記で示したスクリーニング方法により得られる薬物を、化学合成方法によって製造する工程、及び、薬学的に許

容される担体を配合する工程を含む、医薬組成物の製造方法、並びに、当該製造方法により得られる医薬組成物もその要旨に含まれる。

5 医薬組成物として用いる場合において、薬学的に許容される担体としては、例えば、生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定化剤などが挙げられ、これらと薬物とを適宜組合わせて製剤化して提供することが可能である。また、患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、経口的投与も可能であり、薬物に
10 応じて、また、患者の体重や年齢、症状等により適宜選択することができる。投与量についても同様に、薬物に
15 応じて、または、患者の体重や年齢、症状等に応じて、適当な投与量を選択することが可能である。なお、被験化合物がDNAによりコードされ得るものであれば、当該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも可能である。

本発明においては、67LRと結合する化合物であって、ガロイル基を有する化合物が該67LRに結合するサイトと同一のサイトで結合する化合物も本発明のその要旨に含まれる。これらは、後述の実施例に示すように、67LRに対する
20 モノクローナル抗体は、ガロイル基を有する化合物の67LRへの結合を阻害し、その結果ガロイル基を有する化合物の細胞増殖抑制効果を阻害していること；逆に、ガロイル基を有する化合物は抗67LR抗体の67LRへの結合を阻害していること；即ち、ガロイル基を有する化合物の結合部位
25 と抗体認識部位が重なっていることにより、十分裏付けられている。これらの化合物は、ガロイル基を有する化合物が有する作用と同一の作用を有することが考えられるため、細胞増殖抑制剤、血管新生阻害剤、癌細胞の転移活性阻害剤、すなわち、抗癌剤としての使用が可能である。

実施例

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

5 材料および方法

(1) . 細胞および細胞培養

本実験に用いたヒト肺がん細胞株 A549 (ATCC Number: CCL-185) は 10% ウシ胎児血清 (FBS) (Bio Source International, Camarillo, CA) 添加 ERDF 培地 (極東製薬) で 37℃、水蒸気飽和した 5% CO₂ 条件下で継代、維持した。ERDF 培地 1 L 中に 1.125 g の NaHCO₃ (和光純薬, Osaka, Japan) を加えた。細胞は対数増殖期で培養維持した。ヒトバーキットリンパ腫細胞株 DND39 は、5% FBS 添加 RPMI-1640 培地 (Nissui, Japan) で 37℃、水蒸気飽和した 5% CO₂ 条件下で継代、維持した。RPMI-1640 培地中には 100 U/mL ペニシリン (Meiji pharmaceutical Company, Tokyo, Japan)、100 mg/mL ストレプトマイシン (Meiji pharmaceutical Company)、12.5 mM NaHCO₃ (和光純薬)、そして 10 mM HEPES (和光純薬) を添加した。

20 (2) . 緑茶カテキン

緑茶カテキン epigallocatechin-3-0-gallate (EGCG)、epicatechin-3-0-gallate (ECG)、epigallocatechin (EGC)、epicatechin (EC)、catechin (C)、epigallocatechin-3-(3-0-methyl)-gallate (EGCG3"Me) は 5 mM の濃度となるようにリン酸バッファー (PBS) に溶解した。使用する際には適宜解凍して用いた。PBS は、超純水 1 L に対し、NaCl (Nacalai tesque, Inc.) 8.0 g、KCl (Nacalai tesque, Inc.) 0.2 g、Na₂HPO₄ (Nacalai tesque, Inc.) 1.15 g、KH₂PO₄ (Nacalai tesque, Inc.) 0.2 g を溶解し調製した。

Caffeine および quercetin は Nacalai tesque, Inc. より購入し、前者は PBS に後者はジメチルスルホキシド (DMSO) (Nacalai tesque, Inc.) に 5 mM の濃度となるように懸濁し調製した。

5 (3) . 試薬および機器

トリパンブルー (和光純薬) を 1% の濃度となるように PBS に懸濁し、121°C、20 分オートクレーブ滅菌した。

All-trans-retinoic acid (ATRA) は Sigma (St. Louis, MO) より購入しエタノールに溶解した。

10 RNA 抽出に用いた TRIzol は Invitrogen (Carlsbad, CA) より購入した。0.1% ジエチルピロカーボネート (DEPC) 水は Sigma (St. Louis, MO) から購入した。RNA 溶解に用いた DEPC 溶液は DEPC が終濃度 0.1% となるように蒸留水に加えて 2 時間攪拌した後、オートクレーブして調製した。

15 Oligotex-dT30 およびヒト胎盤由来 RNase インヒビターは Takara (Kyoto, Japan) より、Moloney murine leukemia virus (MMLV) ー逆転写酵素は Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK) より購入した。プライマー等のオリゴヌクレオチドは BIOSYNTHESIS (Japan) に合成を依頼した。Taq
20 DNA polymerase は Fermentas (Vilnius, Lithuania)、Ex Taq は Takara より購入した。Polymerase chain reaction (PCR) は GeneAmp PCR System 2400 (Parkin-Elmer, Tokyo, Japan) を使用した。アガロースはウルトラピュアアガロース (Sawaday Technology, Tokyo, Japan) を使用した。

25 クローニングのベクターは、pT_{ARGE}TTM Mammalian Expression Vector System (Promega, Madison, WI) を用いた。精製には QIAGEN Plasmid Midi Kit または、EndoFree Plasmid Maxi Kit (ともに QIAGEN) を用いた。

LB 培地は Bacto Tryptone (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) 10 g および Bacto Yeast Extract (DIFCO LABORATORIES, Detroit, MI) 5 g、NaCl 5 g を超純水で 1 L に溶解し、オートクレーブした。60℃に冷ましてから、150 mg/mL のアンピシリン (アンピシリンナトリウム (和光純薬) を 150 mg/mL となるように超純水に溶解後、フィルター滅菌した) を 1000 mL 加えた。LB プレートは Bacto Tryptone 2 g、Bacto Yeast Extract 1 g、NaCl 2 g、Bacto Agar (DIFCO) 5 g 加え、超純水 200 mL に溶解しオートクレーブした。60℃に冷ましてから、150 mg/mL のアンピシリンを 200 mL 加え、10 mL dish (Falcon) に 10 mL ずつ分注した。Isopropyl-b-D (-)-thiogalactopyranoside (IPTG) は和光純薬より購入し、0.1 M になるように調製した。

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside (X-gal) (和光純薬) を 20 mg/mL となるように N-N-dimethyl-formamide (和光純薬) に溶解した。SOC は、Bacto Tryptone 3 g、Bacto Yeast Extract 0.75 g、NaCl 0.078 g、KCl 0.027 g、H₂O を全量が 148.5 mL になるまで加えた。この溶液をオートクレーブした。これとは別にオートクレーブした 2 M Mg²⁺ 液 (12.324 g の MgSO₄ · 7H₂O、10.165 g の MgCl₂ · 6H₂O を超純水に混ぜ 50 mL にした) を 1.5 mL 加えた。この溶液 100 mL に 1 mL の 2 M グルコース を加えて作成した。

DNA シーケンサーは ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) を使い、その際、ABI PRISM BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits Version 2.0 (Applied Biosystems) を用いた。Template Suppression Reagent (TSR) は Applied Biosystems より購入した。

遺伝子導入には、FuGENE™ 6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いて行った。

フローサイトメトリー解析用の抗ヒト Laminin Receptor 抗体は NEOMARKERS(Fremont, CA) より購入した。ネガティブ
5 コントロール抗体のマウス IgM 抗体は Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA) を用いた。Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マウス IgM ヤギ抗体は Southern Biotechnology Associates, Inc (Birmingham, AL) より購入した。フローサイトメーターには、FACSCalibur
10 (Becton Dickinson) を使用した。

(4) . RNA 抽出および cDNA 合成

あらかじめ 1 mM ATRA で 37℃、24 時間処理した細胞を PBS で洗浄した後、 1×10^7 cells に対し 1 mL の Trizol を加えて速やかに懸濁して完全に溶解させた。室温に 5 分間静置後、0.2 mL のクロロホルムを添加して激しく転倒攪拌した。
15 室温に 3 分間静置後、 $12000 \times g$ 、4℃で 15 分間遠心した。遠心上清に 0.5 mL の 2-プロパノールを添加して激しく転倒攪拌し、室温に 10 分間静置後、 $12000 \times g$ 、4℃で 10 分間遠心した。この上清を除去し、1 mL の 75% エタノールで沈殿を
20 リンスした。 $12000 \times g$ 、4℃で 5 分間遠心後、上清のエタノールを出来る限り除去し、沈殿したトータル RNA を 20 mL の DEPC 水に溶解させた。cDNA 合成は以下に示すようにした。まず、10 mg のトータル RNA に 0.5 mg/mL の (dT)₂₀ プライマーを 1 mL 加え、70℃に 10 分間置いた後、直ちに氷冷すること
25 でアニーリングを行った。次に、10 mM dNTP を 2 mL、RNase inhibitor を 0.1 mL、MLLV-逆転写酵素に添付された 5 x バッファーを 4 mL 加え、DEPC 水で全量が 20mL となるようにした。この混合液を 37℃に 1 時間置き cDNA を合成し、97℃に 5 分間置き酵素を失活させた。

(5) . 67 kDa Laminin receptor (67LR) 発現ベクターの構築

DND39 細胞を 1 mM ATRA で 37℃、24 時間処理した後、RNA 抽出を行い cDNA を合成した。Full-length cDNA (Yow et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85: 6394-6398 (1988)) を参考にしてプライマーを作成した (H-LamininR-F; 5'-ATGTCCGGAGCCCTTGATGTCC- 3'、H-LamininR-R; 5'-TTAAGACCACTCAGTGGTTGCTC -3')。プライマーは 20 mM に調整した。合成した cDNA 1 mL、Ex Taq 0.1 mL、10 x Taq バッファー 2 mL、2.5 mM dNTP 1.6 mL、プライマーをおのおの 0.5 mL、dH2O 14.3 mL を懸濁して、PCR を行った。条件は、初期変性 95℃で 5 分間、変性反応 94℃で 30 秒間、アニーリング 58℃で 30 秒間、伸長反応 72℃で 30 秒間行い、変性反応、アニーリングおよび伸長反応を 25 サイクル行った。1.2% アガロースゲルで電気泳動を行い、目的のバンドを Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製した。このシーケンスを行い、目的のものであることを確認した。T4 DNA Ligase 10 x buffer 1 mL、pT_{ARGET}TM Vector 1 mL、T4 DNA Ligase 1 mL および PCR 産物 2.82 mL、dH2O 4.18 mL 加えて 4℃に一晩置きライゲーションを行った。以下は、サブクローニングと同様の操作を行った。コロニー PCR で正逆判定を行い、コロニーを白金耳で拾って LB 培地に移し、37℃、150 rpm で一晩振とう培養した。これを集菌し、EndoFree Plasmid Maxi Kit で精製した。このシーケンスを行い、67LR であることを確認した。

(6) . 67LR の一過性発現系の構築

構築した 67LR 発現ベクター (pT_{ARGET}- hLamininR) を FuGENETM 6 Transfection Reagent を用いて A549 細胞に導入した。詳細は以下に述べるとおりである。細胞を 1×10^4

cells/mL (10% FBS-ERDF 培地) に調整して播き込んだ。24 時間、37℃に置き細胞を接着させた後、チューブに新たに ERDF 培地を取り FuGENE™ 6 (遺伝子量の 3 倍) を直接加え、穏やかに混ぜた。次に pT_{ARGET}-hLamininR を加え穏やかに混ぜ、室温に 30 分間置いた。これを、培地中に加え 48 時間、37℃に置いた。培地で洗浄後、新鮮な培地に変えた。

(7) . 67LR 強制発現細胞に及ぼす各種成分の影響

67LR 一過性発現細胞に対して、各種成分を種々の濃度添加し、5% FBS 含有 ERDF 培地で 37℃、48 時間処理した。処理後、細胞数の計測およびトリパンブルー染色法による生存率の測定を行った。

また、EGCG 前処理に関しては、終濃度 10 μ g/mL (1% FBS 含有 ERDF 培地) の抗 67LR 抗体を 37℃、30 分間処理した後、EGCG 処理を行い、抗体処理細胞に対する影響も検討した。ネガティブコントロールとしてマウス IgM でも同様の処理を行った。

(8) . 67LR 強制発現細胞に対する各種成分の結合性解析

各種成分 5 μ M と細胞との結合性を表面プラズモン共鳴センサ SPR670 (Nippon Laser and Electronic Lab., Nagoya, Japan) により測定した。測定はまず、タンパク質等の標準的な固定化法を用いて細胞を金膜 (Nippon Laser and Electronic Lab.) に固定した。10 mM の 4,4-Dithio dibutyric acid ; DDA (東京化成工業, Tokyo, Japan) エタノール溶液 (10 mL の 99% エタノール中に 2.38 mg の DDA を溶解し、エタノールでさらに 1/100 に希釈した) に金膜を浸して (金の面を上) に穏やかに室温で 30 分間攪拌した。次に、エタノールで 2 回、金表面に水圧をかけないように洗浄し自己組織化膜 (SA 膜) を導入した。25 mg 水溶性カルボジイミド ; EDC (和光純薬) を 1 mL 超純水に、15 mg N-hydroxysuc

cinimide ; NHS (和光純薬) を 9 mL 1,4-Dioxane (Nacalai
tesque, Inc.) にそれぞれ溶解した。それぞれの溶液を混合
し、SA 膜処理済の金膜を浸して、穏やかに室温で 10 分間攪
拌した。これに 10 mL の超純水を加え、さらに室温で 5 分
5 間攪拌した。超純水で 2 回、金表面に水圧をかけないように
洗浄し、乾燥 (風乾) させてカートリッジにマウントした。細
胞を 3×10^5 cells/mL (フローバッファーである PBS) に調
整し、金膜上に 20 μ L 滴下し 30 分間室温において細胞を固
定化した。その後、PBS で 1、10、25、50 μ M に希釈した緑
10 茶カテキンを注入し、表面プラズモン共鳴角度 (Angle) の変
化を測定することで細胞への結合性をモニターした。

また、EGCG と抗 67LR 抗体との結合競合性試験は、終濃度
10 μ g/mL (1% FBS 含有 ERDF 培地) の抗 67LR 抗体を 37°C、
30 分間処理した後、細胞を金膜に固定化し表面プラズモン共
鳴センサを用いて上記同様に行った。この際、ネガティブ
15 コントロールとしてマウス IgM でも同様の処理を行い測定
した。

(9) . フローサイトメトリー解析

67LR は細胞表面に発現していることが知られているので、
細胞表面上に発現した 67LR を抗ヒト Laminin Receptor
20 (LR) 抗体を用いたフローサイトメトリー解析により検出し
た。細胞を回収し、1.5 mL エッペンドルフチューブで総量 100
 μ L の 1% FBS-PBS 中に細胞が 1×10^6 cells 含まれるよう
に調整し、1 次抗体として抗ヒト LR 抗体を終濃度 10 μ g/mL
25 となるように添加した。4°C で 30 分間インキュベートした後、
PBS で一回洗浄した。次に、2 次抗体として LR 抗体のアイ
ソタイプを認識する抗マウス IgM FITC 標識抗体を総量 25
 μ L の 1% FBS-PBS 中で終濃度 12.5 μ g/mL となるように添
加した。4°C で 30 分間インキュベートした後に PBS で 2 回洗

浄し、再び、PBS に再懸濁しフローサイトメーターにより解析を行った。ネガティブコントロール IgM 抗体を同じ濃度 (10 μ g/mL) で反応させた。細胞表面 67LR 発現量は LR の蛍光強度の中央値で示した。

- 5 また、EGCG 処理が 67LR 細胞表面発現に及ぼす影響を検討するために、1 次抗体を作用させる前に、終濃度 50 μ M となるように調製した EGCG 添加 1% FBS-PBS で細胞を処理し、37°C に 30 分間置いた。これを、PBS で一度洗浄した。以降は上述の作用を 1 次抗体から行い、測定を行った。また、EGCG を
- 10 含まない 1% FBS-PBS でも処理を行い、対照群とした。

(10) . 統計計算

実験結果の統計処理には、Student's, t 検定を用いた。

- 実施例 1 EGCG の細胞結合性および増殖活性に及ぼす 67LR
- 15 遺伝子導入の影響

- 67LR 発現ベクター (pT_{AR}GE T- hLamininR) を FuGENE™ 6 Transfection Reagent を用いて 以下の方法により A549 細胞に導入した。細胞を 1 x 10⁴ cells/mL (10% FBS-ERDF 培地) に調整して播種した。24 時間後、チューブに新たに ERDF
- 20 培地を取り FuGENE™ 6 (遺伝子量の 3 倍) を直接加え、穏やかに混ぜた。次に種々の濃度で pT_{AR}GE T- hLamininR を加え穏やかに混ぜ、室温に 30 分間置いた。これを、培地中に加え 48 時間、37°C に培養を継続した。この 67LR 一過性発現細胞に対して、EGCG を各種濃度で添加し、5% FBS 含有 ERDF 培地
- 25 で 37°C、48 時間処理した。処理後、細胞数の計測およびトリパンブルー染色法による生存率の測定を行った。

結果、67LR を一過性に発現させた細胞において EGCG 濃度依存的に細胞増殖抑制が認められた。また、細胞に導入させた 67LR 遺伝子量に比例して細胞増殖の抑制も認められた。

67LR は細胞膜に存在する膜タンパク質であり、この遺伝子の発現ベクターを導入した細胞で EGCG の効果が増強されたことは、EGCG の結合性が増大したためではないかと考えられる。そこで、この細胞に対する EGCG の結合性を表面プラズモン共鳴センサにより測定した。EGCG は $5 \mu\text{M}$ で用いた。

まず、空ベクターを導入した A549 細胞では、若干の Angle の変化（結合量）しか観察されなかったのに対し、67LR 発現ベクターを導入した細胞では、 $0.25 \mu\text{g}$ 導入細胞ですでに Angle の大幅な増大が認められ、さらに $0.5 \mu\text{g}$ 導入した細胞ではよりいっそうの増大が認められた。このことにより、67LR 発現ベクター導入により EGCG の細胞表面への結合性が増大することが示された。

実施例 1 の結果を図 1、図 2 及び図 3 に示す。

実施例 2 67LR の細胞表面発現量の測定

67LR 発現ベクターを導入することで、EGCG の細胞表面への結合性が増大することは示された。そこで、この結合性の増大が実際に細胞膜上に 67LR 発現が増大したためであるかフローサイトメトリーを用いて検討した。

まず、細胞表面の 67LR の発現量の測定を行った。コントロールの A549 細胞で若干の発現が認められた。この細胞に空ベクター ($0.5 \mu\text{g}$) を導入した細胞ではその発現量にほとんど影響は認められなかった。ところが、67LR 発現ベクター ($0.5 \mu\text{g}$) を導入した細胞では、発現量が大幅に増えており、このことから、細胞表面に 67LR が発現していることが明らかになった。

さらに、EGCG がこの 67LR を介して結合しているかを明白にするため、抗 67LR 抗体を作用させる前に EGCG を作用させた。すると、コントロール細胞で認められていた 67LR の

発現が見かけ上、無くなっていた。また、この現象は、空ベクターを導入した細胞でも同様であった。さらに、67LR 導入細胞でも同様であった。このことは、EGCG をあらかじめ細胞に作用させることで、細胞表面の 67LR に EGCG が先に結合してしまい、抗 67LR 抗体が細胞膜上の 67LR に結合できなくなったため、みかけ上 67LR の発現が検出されなかったと考えられる。

これらの結果から、67LR 発現ベクターを導入することで細胞表面の 67LR 発現が増大することが明らかになり、EGCG の結合性の増大が 67LR の細胞膜発現増大であることが示された。また、この 67LR を介して EGCG は細胞へ結合することが示唆された。すなわち、67LR が EGCG の受容体であると示された。

実施例 2 の結果を図 4 に示す。

実施例 3 EGCG の結合性および増殖抑制活性に及ぼす抗 67LR 抗体の影響

ここまでで、67LR を介して EGCG が細胞へ結合し、増殖抑制活性を発現していることが示された。これをより明らかにするため、今度は 67LR 強制発現細胞に抗 67LR 抗体であらかじめ処理を行った上で、EGCG の結合性および増殖抑制活性に影響が認められないか検討を行った。

まずは、結合性に及ぼす抗体の影響を表面プラズモン共鳴センサにより検討した。抗 67LR 抗体を作用させると、Angle の変化量から EGCG の結合速度および結合量自体の減少が認められた。そうした効果は陰性コントロール抗体では見られなかった。

また、EGCG のがん細胞増殖抑制に及ぼす抗体の影響も検討した。67LR 強制発現細胞ではわずか $0.1 \mu\text{M}$ の濃度の EGCG

でも増殖抑制活性が認められるが、EGCGを作用させる前に抗体処理を行ったところ、その増殖抑制効果が消失した。この時、生存率には影響は認められなかった。この結果より、EGCGの結合のみならず、増殖抑制活性も 67LR への EGCG の結合を介して行われることが示された。

実施例 3 の結果を図 5 及び図 6 に示す。

実施例 4 他の茶成分の結合性および増殖抑制活性に及ぼす 67LR 発現の影響

EGCG が 67LR を介して細胞膜に結合すること、また、がん細胞増殖抑制活性を発現していることを示してきた。この 67LR を介した効果が EGCG 特有のものか検討を行った。そこで、他の茶成分として、主要な緑茶カテキンとして ECG、EGC、EC、C および強い抗アレルギー作用を持ち生体内で安定に存在すると報告がある EGCG3''Me を用いた。カテキン同様に様々な生理機能を有している caffeine、また、同様に多くの生理機能が報告されているフラバノール類の一種である quercetin も検討した。

まず、67LR 強制発現細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。これまでと同様に、0.5 μ g の pT_{ARGE}T-hLamininR を A549 細胞にリポフェクション法により導入し、48 時間、37℃で培養後の細胞に対して各種の茶成分を終濃度 5 μ M となるように作用させた。この状態で、さらに 37℃で 48 時間培養後の細胞数および生存率の測定を行った。その結果、C、EC、EGC、caffeine および quercetin では遺伝子の導入の有無に関わらず、生存率および細胞数には影響は認められなかった。一方、EGCG 同様にガロイル基を有している ECG および EGCG3''Me では、EGCG 同様な増殖抑制効果が認められた。こ

の結果から、ガロイル基を有するような成分は 67LR 強制発現細胞で増殖抑制活性を発現することが示唆された。

また、67LR 強制発現細胞への各種茶成分の結合性を表面プラズモン共鳴バイオセンサにより測定した。A549 細胞に対して C、EC、EGC は結合性を示さず、これは 67LR 強制発現細胞でも変化は認められなかった。また、caffeine および Quercetin も細胞結合性を示さず、強制発現細胞でも変化は認められなかった。ECG および EGCG³Me はいずれも EGCG ほどではないものの、細胞結合性を示しており、67LR 強制発現細胞ではこの結合性が増大することが明らかになった。

実施例 4 の結果を図 7 及び図 8 に示す。

産業上の利用可能性

本発明によれば、67kDa ラミニン・レセプターをターゲットとする薬物の新規なスクリーニング方法が提供可能である。

なお、本出願は、特願 2003-097652 号を優先権主張して出願されたものである。

請求の範囲

1. 被験化合物と67kDaラミニン・レセプターとの結合の度合いを定性的または定量的に測定し、その測定結果より被験化合物が67kDaラミニン・レセプターに結合する場合にはその被験化合物が細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、癌細胞の転移活性阻害作用、神経保護作用、抗アレルギー作用、抗動脈硬化作用、及び／または、クロイツフェルトヤコブ病感染阻害作用を有する薬物であると判断する工程を含む、細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、癌細胞の転移活性阻害作用、神経保護作用、抗アレルギー作用、抗動脈硬化作用、及び／または、クロイツフェルトヤコブ病感染阻害作用を有する薬物のスクリーニング方法。
2. 薬物が、細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、及び／または、癌細胞の転移活性阻害作用を有する薬物である請求項1記載のスクリーニング方法。
3. 請求項1または2に記載のスクリーニング方法により得られる薬物。
4. 有効成分がガロイル基を有する化合物である請求項1から3のいずれかに記載の薬物。
5. 化合物が、カテキン類である請求項4記載の薬物。
6. カテキン類がエピガロカテキンガレートである請求項5記載の薬物。

7. 細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、癌細胞の転移活性阻害作用、神経保護作用、抗アレルギー作用、抗動脈硬化作用、及び／または、クロイツフェルトヤコブ病感染阻害作用により予防及び／または治療し得る疾患のために用いられる請求項3から6のいずれかに記載の薬物。

8. 細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、及び／または、癌細胞の転移活性阻害作用により予防及び／または治療し得る疾患のために用いられる請求項3から6のいずれかに記載の薬物。

9. 疾患が癌である請求項8記載の薬物。

10. 請求項3から9のいずれかに記載の薬物を化学合成方法により製造する工程、及び、薬学的に許容され得る担体を配合する工程を含む、医薬品組成物の製造方法。

11. 請求項10記載の製造方法により得られる医薬品組成物。

12. ガロイル基を有する化合物及び被験化合物と67 kDa ラミニン・レセプターとの結合の度合いを定性的または定量的に測定し、その測定結果より被験化合物と67 kDa ラミニン・レセプターとの結合の度合いが、ガロイル基を有する化合物と67 kDa ラミニン・レセプターとの結合の度合いを上回る場合には、その被験化合物がガロイル基を有する化合物が有する薬理学的作用と同一の作用を有する薬物であると判断する工程を含む、薬物のスクリーニング方法。

1 3 . ガロイル基を有する化合物の 6 7 k D a ラミニン・レセプターに対する結合と、被験化合物の 6 7 k D a ラミニン・レセプターに対する結合とを競合させた結果、被験化合物の 6 7 k D a ラミニン・レセプターへの結合するサイトと、
5 ガロイル基を有する化合物の 6 7 k D a ラミニン・レセプターへの結合するサイトとが、同一の場合には、その被験化合物は、ガロイル基が有する化合物が有する薬理学的作用と同一の作用を有する薬物であると判断する工程を含む、薬物のスクリーニング方法。

1 4 . ガロイル基を有する化合物が有する薬理学的作用が、細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、癌細胞の転移活性阻害作用、神経保護作用、抗アレルギー作用、抗動脈硬化作用、及び／または、クロイツフェルトヤコブ病感染阻害作用である請求項 1 2 または 1 3 に記載のスクリーニング方法。

1 5 . ガロイル基を有する化合物が有する薬理学的作用が、細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、及び／または、癌細胞の転移活性阻害作用である請求項 1 2 または 1 3 に記載のスクリーニング方法。

1 6 . 化合物がカテキン類である請求項 1 2 から 1 5 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

1 7 . カテキン類がエピガロカテキン ガレートである請求項 1 2 から 1 5 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

1 8 . 請求項 1 2 から 1 7 のいずれかに記載のスクリーニング方法により得られる薬物。

35

19. 細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、癌細胞の転移活性阻害作用、神経保護作用、抗アレルギー作用、抗動脈硬化作用、及び／または、クロイツフェルトヤコブ病感染阻害作用により予防及び／または治療し得る疾患のために用いられる請求項18に記載の薬物。
- 5
20. 細胞増殖抑制作用、血管新生阻害作用、及び、癌細胞の転移活性阻害作用により予防及び／または治療し得る疾患のために用いられる請求項18または19に記載の薬物。
- 10
21. 疾患が癌である請求項20記載の薬物。
22. 請求項18から21のいずれかに記載の薬物を化学合成方法により製造する工程、及び、薬学的に許容され得る担体を配合する工程を含む、医薬品組成物の製造方法。
- 15
23. 請求項22に記載の製造方法により得られる医薬品組成物。
- 20
24. 67kDaラミニン・レセプターと結合する化合物であって、ガロイル基を有する化合物が該67kDaラミニン・レセプターに結合するサイトと同一のサイトで結合する化合物。
- 25
25. 化合物がカテキン類である請求項24記載の化合物。
26. カテキン類がエピガロカテキン ガレートである請求項25記載の化合物。

27. 請求項24から26のいずれかに記載の化合物を含む細胞増殖抑制剤。

5 28. 請求項24から26のいずれかに記載の化合物を含む血管新生阻害剤。

29. 請求項24から26のいずれかに記載の化合物を含む癌細胞の転移活性阻害剤。

10 30. 請求項24から26のいずれかに記載の化合物を含む抗癌剤。

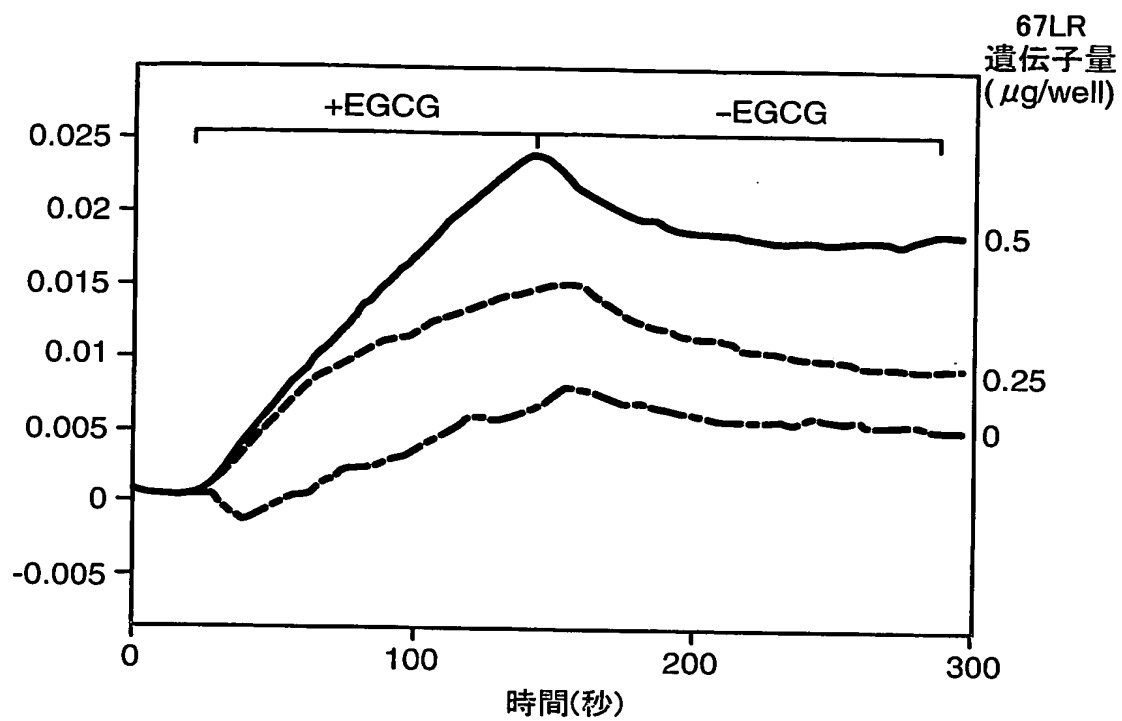
15

20

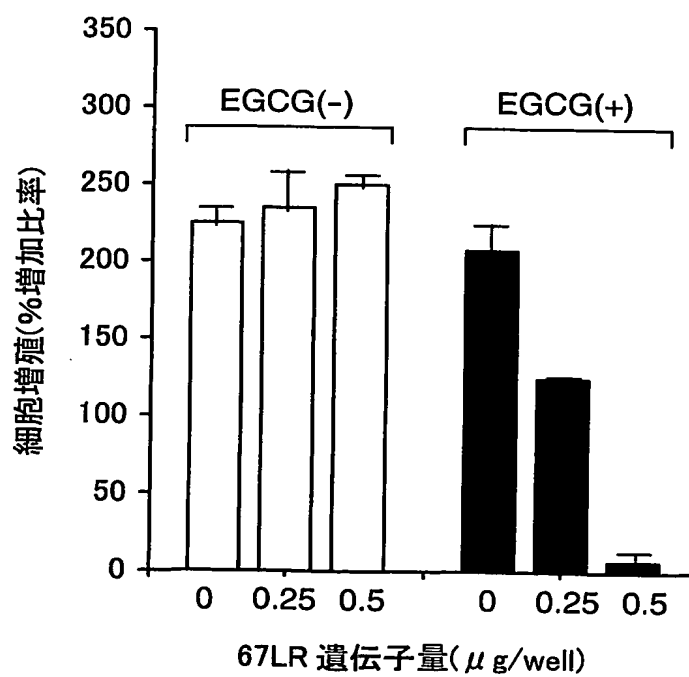
25

1/6

第 1 図

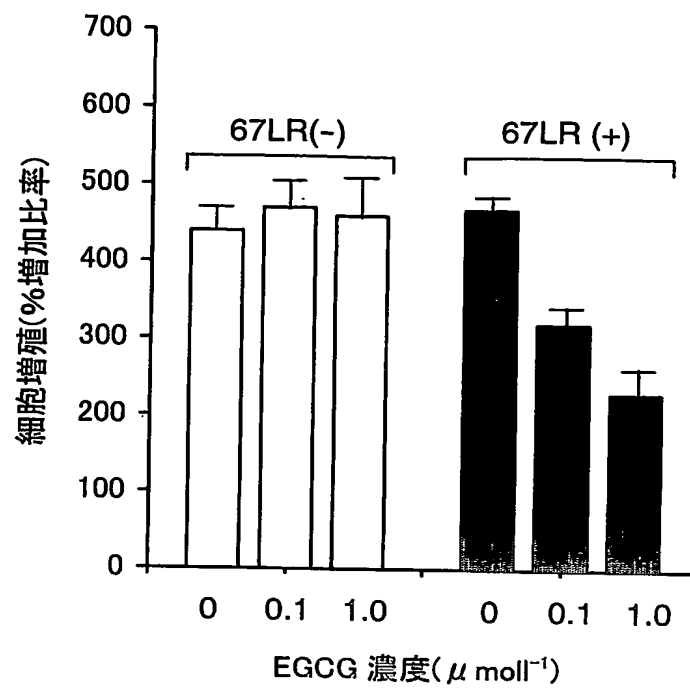


第 2 図



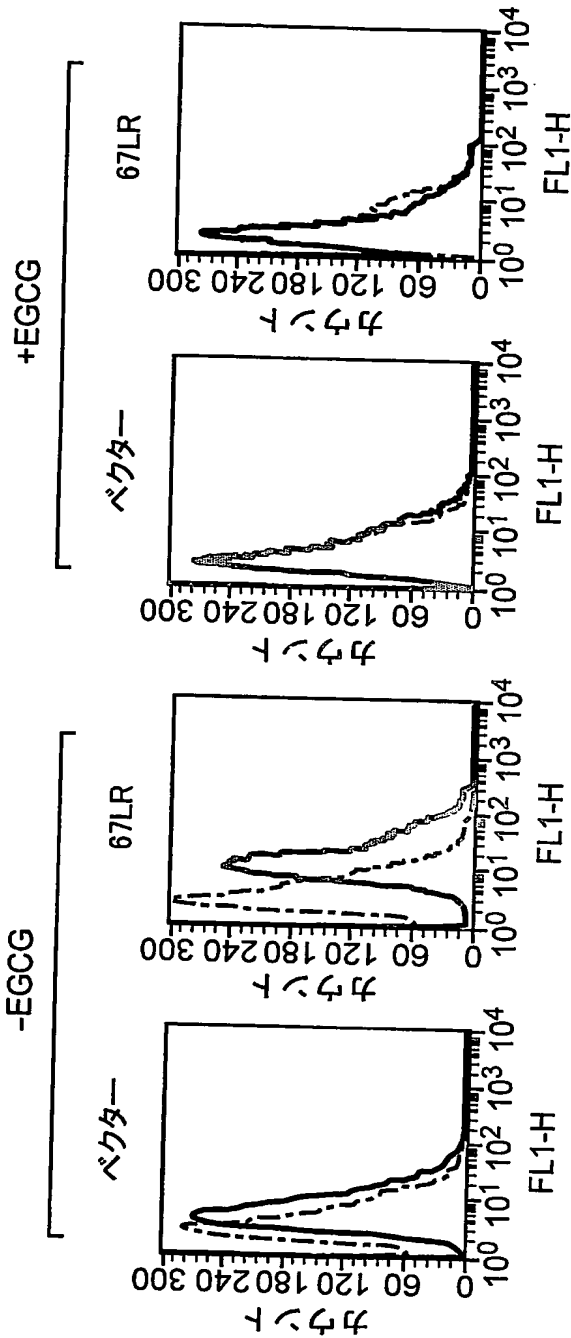
2/6

第3図



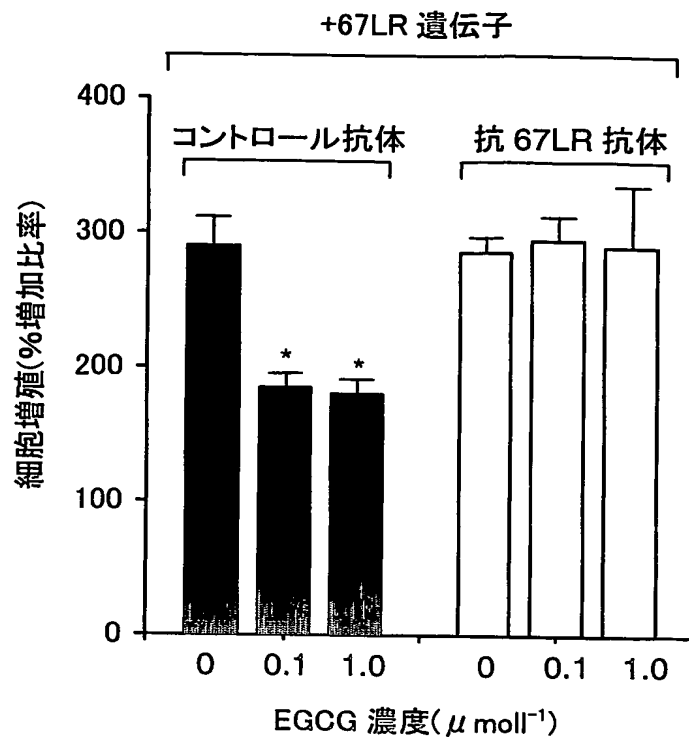
第 4 図

67LRの細胞表面における発現

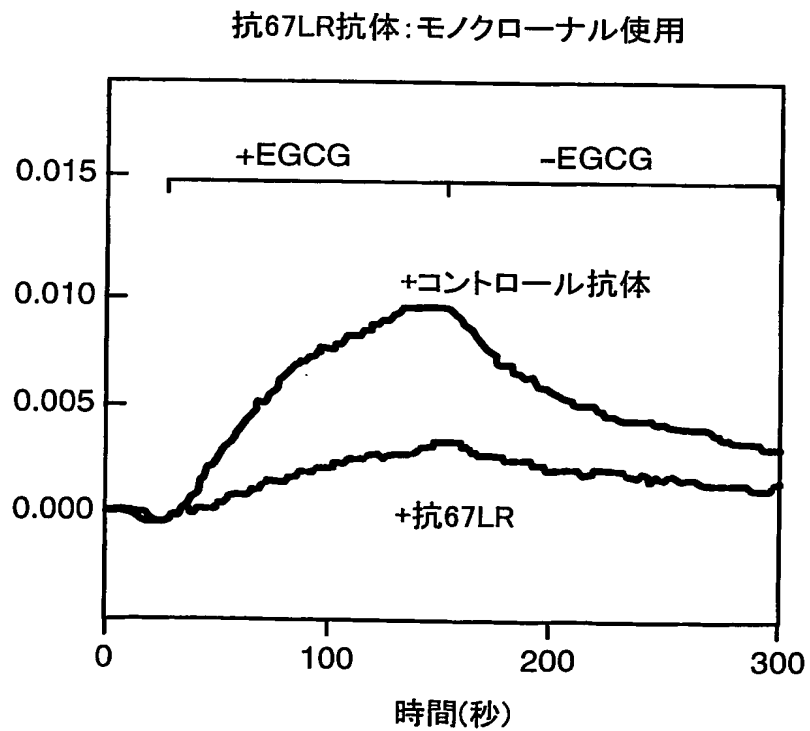


4/6

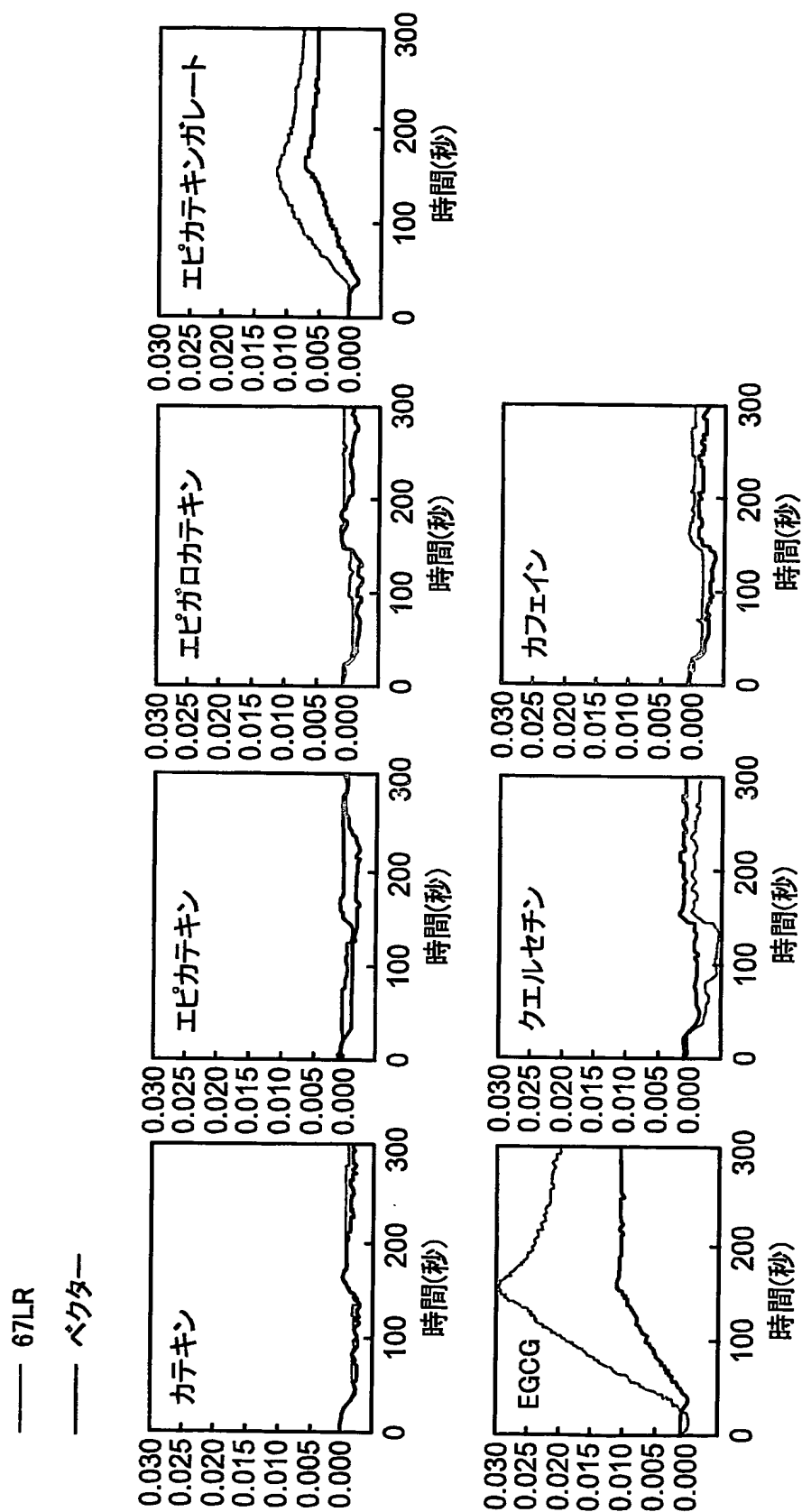
第 5 図



第 6 図

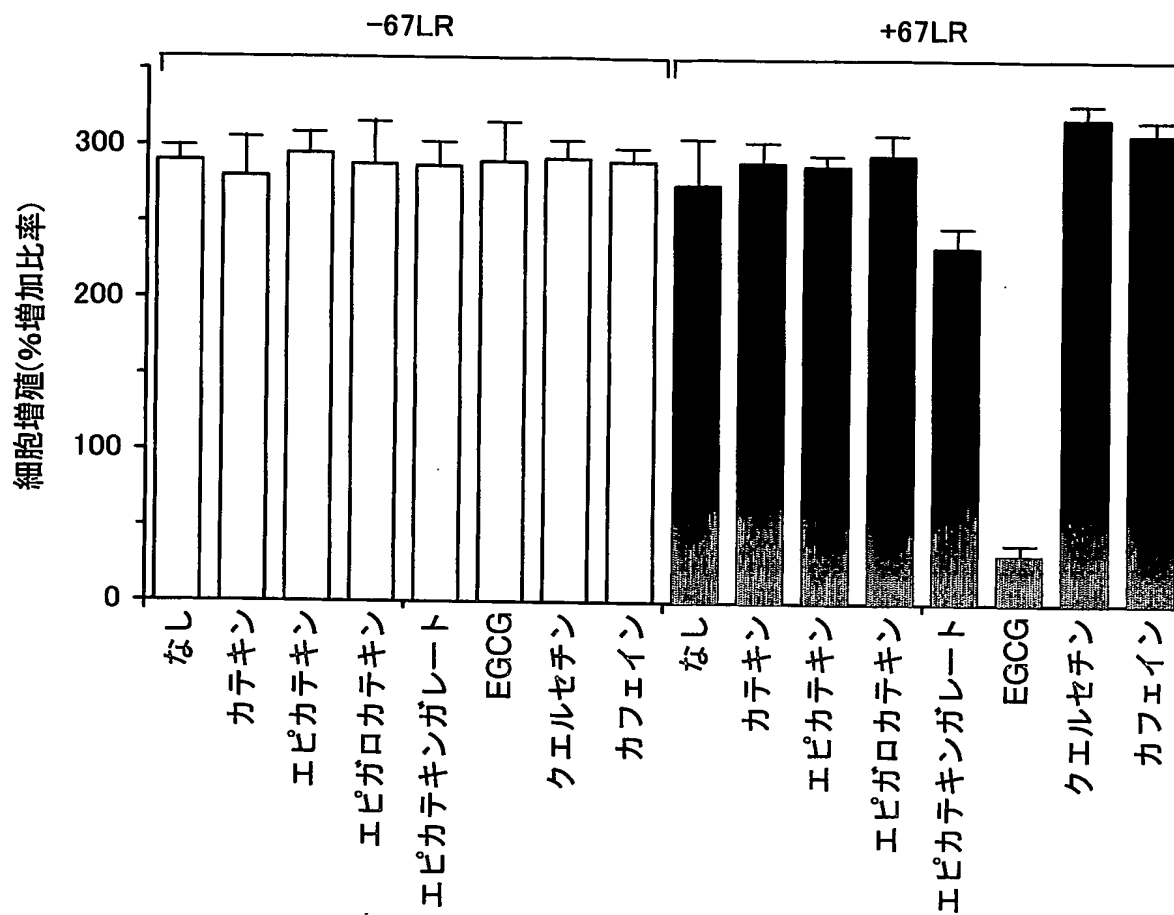


第7図



6/6

第 8 図



BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004772

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/53, G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61K31/353,
A61P9/00, A61P9/10, A61P25/00, A61P25/28, A61P35/00, A61P37/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/53, G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61K31/353,
A61P9/00, A61P9/10, A61P25/00, A61P25/28, A61P35/00, A61P37/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST (JOIS), CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 99/54356 A (THE QUEEN'S UNIVERSITY OF BELFAST), 28 October, 1999 (28.10.99), Full text & EP 1073679 A	1, 2/ 4-6, 12-17, 25-30
X	JP 2000-226329 A (Meiji Milk Products Co., Ltd.), 15 August, 2000 (15.08.00), Claims (Family: none)	25-30
X	JP 2002-220340 A (Ito En, Ltd.), 09 August, 2002 (09.08.02), Claims; Par. Nos. [0005], [0020], [0021] (Family: none)	25-30

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 May, 2004 (18.05.04)

Date of mailing of the international search report
01 June, 2004 (01.06.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004772

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2001-114687 A (Mitsui Norin Co., Ltd.), 24 April, 2001 (24.04.01), Par. No. [0003] (Family: none)	25-30
P,X	TACHIBANA "A receptor for green tea polyphenol EGCG.", Nat.Struct.Mol.Biol., Vol.11, No.4, (2004) pages 380 to 381	1-30
A	JP 8-205885 A (La Jolla Cancer Research Foundation), 13 August, 1996 (13.08.96), & JP 3-504383 A & WO 89/11273 A & EP 452314 A & US 5180809 A	1-30
A	JP 6-219965 A (The United States of America), 09 August, 1994 (09.08.94), & JP 60-500974 A & WO 84/03946 A & US 4565789 A	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004772

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 3, 7-11, 18-24
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
(See extra sheet.)
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004772

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

Claims 3, 7 to 11 and 18 to 24 relate to so-called screening method-specified compounds or compounds specified exclusively by a function and, therefore, it is completely unknown what specific compounds are involved therein and what are not. Thus, these claims are described in an extremely unclear manner.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61K31/353, A61P9/00, A61P9/10, A61P25/00, A61P25/28, A61P35/00, A61P37/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61K31/353, A61P9/00, A61P9/10, A61P25/00, A61P25/28, A61P35/00, A61P37/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-2004年
日本国登録実用新案公報 1994-2004年
日本国実用新案登録公報 1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST (JOIS), CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/ A	WO 99/54356 A (THE QUEEN'S UNIVERSITY OF BELFAST) 1999. 10. 28 全文 & EP 1073679 A	1, 2/ 4-6, 12-17, 25-30
X	JP 2000-226329 A (明治乳業株式会社) 2000. 08. 15 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	25-30
X	JP 2002-220340 A (株式会社 伊藤園) 2002. 08. 09 特許請求の範囲、【0005】 【0020】 【0021】 (ファミリーなし)	25-30

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 05. 2004

国際調査報告の発送日

01. 6. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子

2 J

9 2 1 7

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2001-114687 A(三井農林株式会社)2001. 04. 24 【0003】 (ファミリーなし)	25-30
PX	TACHIBANA "A receptor for green tea polyphenol EGCG." Nat. Struct. Mol. Biol., Vol. 11, No. 4(2004) p. 380-381	1-30
A	JP 8-205885 A(ラ ホヤ キャンサー リサーチ ファウンデーション)1996. 08. 13 & JP 3-504383 A & WO 89/11273 A & EP 452314 A & US 5180809 A	1-30
A	JP 6-219965 A(アメリカ合衆国)1994. 08. 09 & JP 60-500974 A & WO 84/03946 A & US 4565789 A	1-30

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☒ 請求の範囲 3, 7-11, 18-24 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
特別ページを参照。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲 3, 7-11, 18-24 は、いわゆるスクリーニング方法特定化合物又は機能のみによって特定された化合物に関連する請求項であり、具体的にどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのか全く不明であり、前記請求の範囲の記載は著しく不明確である。